

PCT

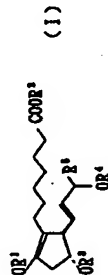
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

世界知的所有権機関
国際事務局

(51) 国際分類 A61K 31/557	AI	(11) 国際公開番号 WO99/09992 (43) 国際公開日 1999年3月4日 (04.03.99)
(31) 国際出願番号 PCT/JP98/03754 (32) 国際出願日 1998年4月24日 (24.04.98) (33) 優先権主張 1997年3月27日 (27.03.97) 特願 97-231110	(71) 出願人 (米国を主とする特許権者について) YOSHITOMI PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. [JP/JP] 〒541-0046 大阪府大阪市中央区東船場二丁目6番9号 Osaka, (JP) 水島 裕 (YOSHITOMI PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒114-0022 東京都港区赤坂五丁目1-11 Tokyo, (JP) 生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP] 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目1番4号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 江本昭雄 (Gai, Yoshino) [JP/JP] 久保田 (KUBO, Yoshio) [JP/JP] 西川昌子 (KIDO, Hideo) [JP/JP] 井 一孝 (HAYASHI, Kazumasa) [JP/JP]	(75) 代理人 〒573-1153 大阪府枚方市相模大谷2丁目25番1号 世富製薬株式会社 大阪研究所内 Osaka, (JP) 井上 理 (INOUE, Saburo) [JP/JP] 〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町二丁目6番9号 世富製薬株式会社内 Osaka, (JP) (74) 代理人 水島 裕 一 (YAKASHIMA, Hajime) 〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町三丁目1番9号 (池水ビル) Osaka, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GR, GM, GU, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ABPO (特許) (CH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KZ, KG, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAP (特許) (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).

(54) Title: NEOVASCULARIZATION PROMOTERS

(50) 発明の名称: 血管新生促進剤

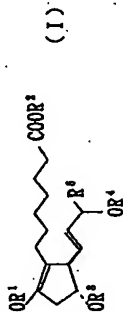


(57) Abstract

Neovascularization promoters which contain as the active ingredient compounds represented by general formula (I), wherein R¹ represents aryl, R² represents alkyl, R³ and R⁴ are the same or different and each represents hydrogen or a hydroxy-protective group, and R⁵ represents allyl. These compounds not only have the effect of promoting neovascularization by themselves but also potentiate the neovascularization by drugs having neovascularizing effects such as b-FGF. Therefore, these compounds can potentiate the neovascularization in an ischemic tissue or at a site where b-FGF is locally increased due to other pathological factors.

(57) 要約

一般式 (I)



(式中、R¹ はアシルを、R² はアルキルを、R³、R⁴ は同一または異なる水素原子又は水酸基の保護基を、R⁵ はアルキルを示す。)

で表される化合物を有効成分とする血管新生促進剤である。

上記化合物は、それ自体が単独で血管新生促進作用を有するだけでなく、b-FGF等の血管新生作用を有する薬物による血管新生作用を増強させる。従って、虚血組織や他の病態下でb-FGFが局所的に増加している部位に対して、血管新生促進作用をより一層顕著させることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	SK	スロバキア
AM	アルメニア	FR	フランス	SL	スロベニア
AU	オーストラリア	GB	英国	SM	サンマリノ
AZ	アゼルバイジャン	GD	グアドループ	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GG	ギブラルター	SR	セルビア
BB	バハマ	GM	ギニア	SS	南スーダン
BF	ブルキナファソ	GN	ギニア	TD	チュニジア
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HR	クロアチア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	UG	ウガンダ
CH	スイス	IN	インド	US	米国
CN	中国	IT	イタリア	UY	ウルグアイ
CO	コロンビア	JP	日本	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ	KE	ケニア	VN	ベトナム
DE	ドイツ	KG	キルギス	ZW	ジンバブエ
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン		
EE	エストニア	LC	レソト		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン		
FI	フィンランド	LU	ルクセンブルグ		
FR	フランス	LV	ラトヴィア		
GB	英国	LY	リビア		
GD	グアドループ	MC	モナコ		
GG	ギブラルター	MD	モルドバ		
GM	ギニア	ML	マリ		
GN	ギニア	MN	モンゴル		
GR	ギリシャ	MW	マラウイ		
HR	クロアチア	MX	メキシコ		
HU	ハンガリー	MY	マレーシア		
IL	イスラエル	NZ	ニュージーランド		
IN	インド	NO	ノルウェー		
IT	イタリア	PE	ペルー		
JP	日本	PG	パプアニューギニア		
KE	ケニア	PH	フィリピン		
KG	キルギス	PL	ポーランド		
KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
LC	レソト	RO	ルーマニア		
LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア		
LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン		
LV	ラトヴィア	SG	シンガポール		
LY	リビア	SI	スロベニア		
MC	モナコ	SK	スロバキア		
MD	モルドバ	SR	セルビア		
ML	マリ	SS	南スーダン		
MN	モンゴル	TD	チュニジア		
MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン		
MX	メキシコ	TR	トルコ		
MY	マレーシア	UA	ウクライナ		
NZ	ニュージーランド	UG	ウガンダ		
NO	ノルウェー	US	米国		
PE	ペルー	UY	ウルグアイ		
PG	パプアニューギニア	UZ	ウズベキスタン		
PH	フィリピン	VN	ベトナム		
PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ		
PT	ポルトガル				
RO	ルーマニア				
RU	ロシア				
SE	スウェーデン				
SG	シンガポール				
SI	スロベニア				
SK	スロバキア				
SL	スロベニア				
SM	サンマリノ				
SN	セネガル				
SR	セルビア				
SS	南スーダン				
TD	チュニジア				
TM	トルクメニスタン				
TR	トルコ				
UA	ウクライナ				
UG	ウガンダ				
US	米国				
UY	ウルグアイ				
UZ	ウズベキスタン				
VN	ベトナム				
ZW	ジンバブエ				

ム化、エタノール溶液化、脂肪乳剤化等、適当な形態に製剤化することにより使用することができる。好ましくは脂肪乳剤の形態であり、これは徐放性、持続性、局所集積性に優れ、保存安定性も良好である。

次に、好ましい形態としての脂肪乳剤について説明する。本発明において、PGE₁前駆体を含有する脂肪乳剤（以下「PGE₁前駆体含有脂肪乳剤」ともいう。）とは、PGE₁前駆体を含有してなり、しかも油成分が分散媒に液滴として分散してなる製剤をいう。

油成分としては、植物油、中鎖脂肪酸トリグリセリド（いわゆるMCT）、魚油等が挙げられる。これらは1種でも2種以上でも用いることができる。植物油としては、例えば大豆油、ゴマ油、ヒマシ油、綿実油、オリーブ油等が挙げられる。これらは公知の手法により、臨床的に安全に使用できる程度に精製されている。好ましくは高純度の精製大豆油であり、より好ましくは精製大豆油を例えば水蒸気蒸留法によりさらに精製して得た高純度の精製大豆油（純度：トリグリセリド、ジグリセリドおよびモノグリセリドとして99.9%以上含有）である。

油成分を分散媒に分散させるために、リン脂質等を乳化剤として用いる。リン脂質としては、卵黄リン脂質、大豆リン脂質等が挙げられ、特にこれらの精製リン脂質が好ましく用いられる。この精製リン脂質は、常法に従い、有機溶媒による分画法によって調製することができる。精製リン脂質は、主としてホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンからなり、これ以外のリン脂質としてホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン等も含有するものである。また、精製リン脂質からホスファチジルエタノールアミンを實質的に除去したもの、具体的には含量約1w/w%以下にまで除去したものをを用いてもよく、これは、卵黄、大豆等のリン脂質を使用し、常法によって有機溶媒分画を行った後、シリカゲル、アルミナ等の無機吸着剤によって精製することにより得られる。かくして得られたリン脂質は、主としてホスファチジルコリンからなる（特開昭60-149524号公報（対応USP4684683、

EP-A-150732)。さらに、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンあるいはホスファチジルイノシトールそのものを用いることもできる。分散媒としては、水等が挙げられ、好ましくは精製水である。当該PGE₁前駆体含有脂肪乳剤は、主として、植物油5~50% (w/v)、植物油100重量部に対してリン脂質1~300重量部、好ましくは5~100重量部、より好ましくは10~50重量部、および適量の水からなるものである。

また、本発明におけるPGE₁前駆体含有脂肪乳剤は、上記成分の他、必要に応じて、さらに乳化補助剤、保存剤、安定化剤、高分子物質、等張化剤等を加えることもできる。

乳化補助剤としては、炭素数6~22、好ましくは12~20の脂肪酸またはその薬理学的に許容される塩、および炭素数2~22の脂肪酸アミン等が挙げられる。脂肪酸は、医薬品に添加可能なものであれば特に制限はなく、直鎖状、分枝状のいずれでもよいが、具体的には直鎖状のステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、リノレン酸、ミリスチン酸等を用いるのが好ましい。また、これら脂肪酸の薬理学的に許容される塩としては、例えばアルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩等）等を挙げることができる。さらに、脂肪酸アミンとしては、医薬品に添加可能なものであれば特に制限はなく、例えば直鎖状または分枝状の炭素数2~22の第一級アミン、第二級アミン等が例示され、具体的にはエタノールアミン、プロピルアミン、オクチルアミン、ステアarylアミン、オレイルアミン等が挙げられる。当該乳化補助剤の配合量は、脂肪酸またはその塩は0.3% (w/v)以下、また脂肪酸アミン等は0.1% (w/v)以下の量であることが好ましい。

安定化剤としては、医薬用として使用可能なものであれば特に制限はなく、コレステロール類、ホスファチジン酸等が挙げられる。その配合量は、コレステロール類は好ましくは0.5% (w/v)以下、より好ましくは0.1% (w/v)

以下であり、またホスファタジンは好ましくは5% (w/v) 以下、より好ましくは1% (w/v) 以下である。

高分子物質としては、医薬用として使用可能なものであれば特に制限はなく、アルブミン、デキストラン、ビニル重合体、非イオン性界面活性剤、ゼラチン、ヒドロキシエチル澱粉等が挙げられる。アルブミンとしては、抗原性の問題等からヒト由来のものが用いられる。ビニル重合体としては、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。非イオン性界面活性剤としては、ポリアルキレングリコール (例えば平均分子量1,000 ~ 10,000、好ましくは4,000 ~ 8,000 のポリエチレングリコール等)、ポリオキシアルキレン共重合体 (例えば平均分子量1,000 ~ 20,000、好ましくは8,000 ~ 10,000 のポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体等)、硬化ヒマシ油ポリオキシアルキレン誘導体 (例えば、硬化ヒマシ油ポリオキシエチレン- (20) - エーテル、同- (40) - エーテル、同- (100) - エーテル等)、ヒマシ油ポリオキシアルキレン誘導体 (例えば、ヒマシ油ポリオキシエチレン- (20) - エーテル、同- (40) - エーテル、同- (100) - エーテル等) 等を用いることができる。その配合量は、PGE、前駆体100重量部に対して、高分子物質は好ましくは10 ~ 500重量部、より好ましくは50 ~ 100重量部である。

等張化剤としては、グリセリン、ブドウ糖等が挙げられる。

上記脂肪乳剤中に含有させるPGE、前駆体の量は、乳剤の形態および用途によって適宜増減できるが、一般には当該乳剤中に極微量 (例えば約0.1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 含有させることで十分である。

PGE、前駆体含有脂肪乳剤の特に好ましい組成としては、例えば次のものが例示される。

PGE、前駆体	1 ~ 100 μg
精製大豆油	50 ~ 500 mg
高度精製レシチン	5 ~ 50 mg
オレイン酸	0.1 ~ 5 mg
濃グリセリン	5 ~ 50 mg
蒸留水	適量
合計	1 ml

PGE、前駆体含有脂肪乳剤の製造方法は、特に限定されず種々の方法により調製でき、基本的には、PGE、前駆体とその他の油成分からなる油液状物に、分散媒としての水、特に精製水を加え、適当な方法で乳化し、全質を均等にするることによって調製される。具体的には、次の方法等が挙げられる。即ち、所定量のPGE、前駆体、油成分 (好ましくは大豆油)、リン脂質、および必要に応じてその他の前記の添加剤等を混合、加熱して溶液となし、常用のホモジナイザー (例えば高圧噴射型ホモジナイザー、超音波ホモジナイザー等) を用いて均質化処理することにより油中水型分散液を作り、次いでこれに必要な量の水を加え、再び前記ホモジナイザーで均質化を行って、水中油型乳剤に変換することにより製造することができる。製造上の都合によっては、脂肪乳剤の調製後に安定化剤、等張化剤等の添加剤を加えてもよい (特開昭58-222014号公報 (対応USP4493847、EP-A-97481))。

上記処理に引き続いて、滅菌・除菌処理を施してもよい。滅菌処理としては、通常の方法が用いられ、例えば滅菌濾過法、 γ 線照射法、高圧加熱処理法等が挙げられる。

かくして調製されたPGE、前駆体含有脂肪乳剤は、そのまま、もしくは所望によりさらに他の成分を添加することにより、本発明の促進剤とすることができ、他の成分としては、エイコサペンタエン酸 (いわゆるEPA)、ドコサヘキサエン酸 (いわゆるDHA) 等が挙げられる。当該脂肪乳剤の平均粒子径は、好ましくは1 μm 以下、より好ましくは0.2 ~ 0.4 μm である。

当該PGE₁、前駆体を用い、脂肪乳剤以外の形態に製剤化する場合について、以下に説明する。

シクロデキストリン(CD)包接化は、例えば、PGE₁、前駆体を溶媒(エタノール等)に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水等に加温溶解した溶液を加えた後、冷却し、析出した沈澱を濾過し、減圧乾燥することにより行うことができる。

リポソーム化は、例えば、リン脂質を溶媒(クロロホルム等)に溶解した溶液に、PGE₁、前駆体を溶媒(エタノール等)に溶解した溶液を加えた後、溶媒を除去し、これにリン酸緩衝液を加え、振盪、超音波処理および遠心分離した後、上清をメンブランフィルター等で濾過することにより行うことができる。

エタノール溶液化は、PGE₁、前駆体をエタノールに溶解することにより行うことができる。なお、当該エタノール溶液は、用時、生理食塩液またはブドウ糖液等で希釈して用いる。

なお、上記脂肪乳剤およびその他の製剤は常法により、pH、塩濃度、浸透圧などを調整することができる。また、必要に応じて凍結乾燥製剤とすることも可能である。

本発明の促進剤は、PGE₁、前駆体自体が血管新生促進作用を有するのみならず、成長因子による血管新生作用を増強する作用をも有する。

本発明の血管新生促進剤は注射剤等の形態として非経口で投与することができ、特に静脈内投与が好ましい。その投与は、例えばPGE₁、前駆体として1日に1～1000 μ g投与することが好ましく、0.01～1000ng/kg/分の割合で1日1回静脈内に持続注入することにより行うことができる。

また、本発明の血管新生促進剤は、血管新生作用を有する公知の薬物と併用することにより、当該作用を増強させることができる。この場合、本発明の血管新生促進剤と血管新生作用を有する薬物とは、同時期に生体内に存在するように投与すればよい。両者は一緒に製剤化してもよく、または別個に製剤化してもよい。別個に製剤化する場合には、投与経路・用法は同一でもよく、また別々であって

もよい。

血管新生作用を有する公知の薬物としては、成長因子(グロース・ファクター)、ヘパリン、アデノシン、ジピリダモール等が例示される。成長因子としては、b-FGF、TGF(トランスフォーミング成長因子) β 、VEGF(血管内皮細胞増殖因子)、HGF(肝細胞成長因子)、EGF(上皮細胞成長因子)等が例示される。これらの用法、用量は公知の範囲であれば、特に限定されるものではない。

図面の簡単な説明

図1は、試験例1における溶媒投与群の血管新生の結果を示す写真である。図2は、試験例1におけるAS投与群の結果を示す写真である。図3は、試験例2における溶媒単独投与群(第1群)の結果を示す写真である。図4は、試験例2におけるb-FGF投与群(第2群)の結果を示す写真である。図5は、試験例2におけるASとb-FGFの併用群(第3群)の結果を示す写真である。

実施例・試験例

本発明をより詳細に説明するために、実施例及び試験例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

実施例1(CD包接化)

ブチル 9-ブチリルオキシ-11 α , 15S-ジヒドロキシプロスタ-8, 13E-ジエン-1-オエート(以下「AS」という。)17mgをエタノール0.2mlに溶解した溶液に、 β -シクロデキストリン257mgを水6mlに加温溶解して調製した溶液を加え、45℃で加温溶解した後に室温に冷却し、沈澱を析出させた。これを0℃で一晩放置後に濾過し、50%エタノール水溶液で洗浄した後、減圧乾燥することにより、シクロデキストリン(CD)包接化物を得た。

実施例2(リポソーム化)

卵黄ホスファチジルコリン60mgおよびオレイルアミン11mgをクロロホルム5mlに溶解後に、AS30 μ gをエタノール100 μ lに溶解したものを加え、ナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。これに、

0.1M等張リン酸緩衝液(pH5)1mlを加え、振盪、超音波処理(ソニケーター)及び速心分離した後、上清を0.2μmのメンブランフィルターで濾過し、リポソーム製剤を得た。

実施例3 (エタノール溶液化)

AS500μgをエタノール1mlに溶解することにより、エタノール溶液剤を得た。これは、用時、生理食塩液またはブドウ糖液等で希釈して用いる。

実施例4 (脂肪乳剤化)

精製大豆油30gに精製卵黄リン脂質5.4g、AS1.5mg及びオレイン酸0.72gを加え、40〜75℃で加熱溶解した。これに、蒸留水200mlを加え、次いで日本薬局方グリセリン7.5gを加え、20〜40℃の注射用蒸留水で全量を300mlとし、ホモジナイザーで粗乳化した。これをマントン-ガウリン型ホモジナイザーを用い、1回目120kg/cm²、合計500kg/cm²の加圧下で、10回通過させて乳化させることにより、均質化された極めて微細のPGE₁前駆体を含有する脂肪乳剤を得た。この乳剤の平均粒子径は0.2〜0.4μmであり、1μm以上の粒子を含有しなかった。

試験例1

本発明の促進剤を用いて、血管新生作用を評価した。

①使用製剤

本発明の促進剤として、実施例4のAS含有脂肪乳剤を10%脂肪乳剤(イントラリポス、ミドリ十字社製、なお、1998年4月1日より吉富製薬株式会社が製造販売中)で希釈したものを用いた。対照の溶媒投与群は上記の10%脂肪乳剤のみを用いた。

②試験方法

ラットを麻酔し、背部正中線部を約1cm切開して尾部側の2.5cmのところにコッヘルで皮下にエアークケットを作り、生理食塩水を吸収させた止血ゼラチンスポンジ(スポンゼル、1.0×1.0×0.5cm、山之内製薬社製)を包埋して、ラットスポンジモデルを作製した。

続いて切開部を縫合、消毒した後、抗生物質を投注して飼育ケージに戻した。各製剤をスポンジ包埋当日から4日まで、尾静脈より1日1回ボラス投与した。包埋4日目に各群8匹ずつ動物を致死させた後に、背部を切開して埋め込んだスポンジを傷つけないように周囲組織を剝離し、スポンジ表面を写真撮影した。その後、すべてのスポンジを取り出して、0.1Mのアンモニア水を2ml加え、4時間放置してスポンジ内のヘモグロビンを抽出した。抽出液100μl中のヘモグロビン含量をアッセイキット(ヘモグロビンB-テラストワコー、和光純薬社製)を用いて定量し、スポンジ内ヘモグロビン含量を算出して血管新生の指標とした。

③統計処理

血管新生作用の評価は、溶媒投与群を対照として、Dunnett法による多重比較検定を行い、有意性を検討した。危険率が5%未満のものを有意差ありとした。

④結果

i) スポンジ内ヘモグロビン含量(表1)

AS(3μg/kg)を連日静脈内ボラス投与すると、溶媒投与群に比して、ASはヘモグロビン含量を増加させ、有意差が認められた。

表1

	包埋4日後の ヘモグロビン含量 (mg/スポンジ)
溶媒投与群 (1ml/kg)	1.5 ± 0.9
AS投与群 (3μg/kg)	4.4 ± 0.8 *

表中の数値は平均±標準偏差を表す。

* P < 0.05 対溶媒投与群 (Dunnett 法)

ii) 写真所見

溶媒投与群(図1)では、スポンジ表面に新生血管が若干であるが観察された。AS投与群(図2)では肉眼で観察できるほどの顕著な血管網が認められ、良好

な血管新生が起きていた。

iii) まとめ

ASを投与すると、顕著な血管網が観察され、溶媒投与群に比してスポンジ内ヘモグロビン含量の有意な増加が見られたことから、ASにより血管新生が促進されることが明らかとなった。

試験例 2

本発明の促進剤を用いて、b-FGFによる血管新生の促進作用を評価した。

①使用製剤

試験例 1と同様に、本発明の促進剤として、実施例 4のAS含有脂肪乳剤を10%脂肪乳剤（イントラリス、ミドリ十字社製、なお、1998年4月1日より吉富製薬株式会社が製造販売中）で希釈したものを用いた。対照の溶媒投与群は上記の10%脂肪乳剤のみを用いた。

②試験方法

0.1%BSA（ウシ血清アルブミン）含有生理食塩水又はb-FGF溶液（b-FGF 1 mg/ml溶液 100 μ lを0.1%BSA含有生理食塩水で10倍希釈して調製したもの）を吸収させた止血用ゼラチンスポンジを用いて、実施例 1と同様にラットスポンジモデル（各群6〜8匹）を作製した。溶媒及びASをスポンジ包埋日から4日目まで、1 ml/kgの用量で尾静脈より1日1回ボラス投与した。包埋4日後に、実施例 1と同様にして、スポンジ表面の写真撮影を行い、またスポンジ内のヘモグロビン含量を算出した。

③統計処理

血管新生作用の評価は、溶媒単独投与群（スポンジ内BSA含有生理食塩水+10%脂肪乳剤静注）を対照として、Dunnett法による多重比較検定（第1群対第2、3群）を行い、有意性を検討した。ASとb-FGFとの相互作用については、b-FGF単独投与群を対照として対応のないt検定（第2群対第3群）を行って、有意性を検討した。なお、危険率が5%未満のものを有意差ありとした。

④結果

i) スポンジ内ヘモグロビン含量（表2）

b-FGF単独投与群において、包埋4日後にはスポンジ内ヘモグロビン含量の増加が認められた。一方、ASとb-FGFを併用した群ではb-FGF単独投与群に比べ、有意にスポンジ内ヘモグロビン含量を増加させた。

表 2

備 注	スポンジ内	包埋4日後の スポンジ内 ヘモグロビン含量 (mg/スポンジ)	例 数 (n)
10%脂肪乳剤 投与 (1 ml/kg)	0.1%BSA/生理食塩水 (100 μ l/スポンジ)	6.5 \pm 0.7	第1群 6
	b-FGF (1 μ g/スポンジ)	11.8 \pm 0.9	第2群 8
AS投与 (3 μ g/kg)	b-FGF (1 μ g/スポンジ)	20.7 \pm 3.1	第3群 7

表中の数値は平均±標準誤差を表す。

$P < 0.05$ 対b-FGF単独投与群（対応のないt検定）

ii) 写真所見

溶媒単独投与群（第1群）では、スポンジ周辺にわずかに血管が観察されるにとどまった（図3）。また、b-FGF投与群（第2群）では、スポンジ表面に多数の血管が伸展している像が観察され、血管網の形成が認められた（図4）。一方、ASとb-FGFの併用群（第3群）では、さらに顕著な血管網の形成が認められ、血管径も太くなっていることが判明した（図5）。

iii) まとめ

ASとb-FGFを併用すると、b-FGFの血管新生促進作用が増強されることが明らかとなった。よって、ASは単独で血管新生促進作用を有するだけでなく、b-FGFの作用を増強させることから、虚血組織や他の病態下でb-FGFが局所的に増加している部位に、ASの血管新生促進作用により一層発現されるものと考えられる。

試験例 3 (毒性試験)

実施例 4 の脂肪乳剤をマウス、ラット及びビヌに PGE₁ 前駆体として 250 μ g/体重まで静脈内投与しても死亡例はなく、重篤な毒性は発現しなかった。

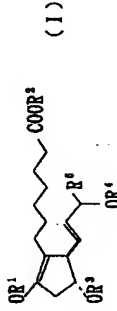
産業上の利用可能性

本発明の促進剤の有効成分である PGE₁ 前駆体は、それ自身が単独で血管新生促進作用を有するだけでなく、b-FGF 等の血管新生作用を有する薬物による血管新生作用を増強させる。従って、虚血組織や他の病態下で b-FGF が局所的に増加している部位に対して、血管新生促進作用をより一層発現させることができる。

本出願は日本で出願された平成 9 年特許第 231110 号を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. 一般式 (I)



[式中、R¹ はアシルを、R² はアルキルを、R³、R⁴ は同一または異なって水素原子又は水酸基の保護基を、R⁵ はアルキルを示す。]

で表される化合物を有効成分とする血管新生促進剤。

2. R¹ は炭素数 2～8 のアシルを、R² は炭素数 1～30 のアルキルを、R³、R⁴ は同一または異なって水素原子、アシルまたはアラルキルを、R⁵ は炭素数 1～10 のアルキルを示す請求の範囲 1 記載の血管新生促進剤。

3. R¹ は炭素数 2～4 のアシルを、R² は炭素数 1～4 のアルキルを、R³、R⁴ は同一または異なって水素原子、アセチル、プロピオニル、ベンゾイル、ベンジル、フェニルエチルを、R⁵ は炭素数 5～7 のアルキルを示す請求の範囲 1 記載の血管新生促進剤。

4. 一般式 (I) で表される化合物がブチル 9-ブチリルオキシ-11a, 15S-ジヒドロキシプロスタ-8, 13E-ジエン-1-オエートである請求の範囲 1 記載の血管新生促進剤。

5. 脂肪乳剤の態様である請求の範囲 1 記載の血管新生促進剤。

6. 請求の範囲 1 記載の化合物を有効成分とする、血管新生作用を有する薬物の当該作用の増強剤。

7. 血管新生作用を有する薬物が成長因子、ヘパリン、アデノシンまたはジリダモールである請求の範囲 6 記載の血管新生作用増強剤。

8. 成長因子が b-FGF、TGFβ、VEGF、HGF または EGF である請求の範囲 7 記載の血管新生作用増強剤。

9. 請求の範囲 1 記載の化合物の有効量を患者に投与することからなる血管新生を促進する方法。

10. 血管新生促進剤を製造するための請求の範囲 1 記載の化合物の使用。

11. 請求の範囲 1 記載の化合物の有効量を患者に投与することからなる血管新生作用を有する薬物の当該作用を増強する方法。

12. 血管新生作用を有する薬物の当該作用の増強剤を製造するための請求の範囲 1 記載の化合物の使用。

図 1

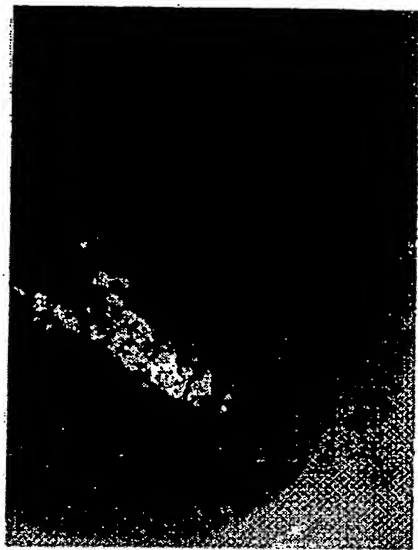


図 2



PCT/JP98/03754

WO 99/09992

☒ 5



3 / 3

PCT/JP98/03754

WO 99/09992

☒ 3



☒ 4



2 / 3

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/03754

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ¹ A61K31/557	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ¹ A61K31/557	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
Y	JP, 5-213862, A (Yutaka Mizushima, Seikagaku Corp., Asahi Glass Co., Ltd.), 24 August, 1993 (24. 08. 93), Claims ; page 2, right column, line 15 to page 3, left column, line 21, right column, lines 29 to 33 * EP, 423697, A1 * US, 5120870, A * US, 5194670, A
Y	JP, 3-204853, A (Yutaka Mizushima, Seikagaku Corp., Asahi Glass Co., Ltd.), 6 September, 1991 (06. 09. 91), Claims ; page 3, lower left column, line 5 to page 7, lower right column, line 11 * EP, 423697, A1 * US, 5120870, A * US, 5194670, A
Y	M. ZICHE, et al., "Angiogenesis Can Be Stimulated or Repressed In vivo by a Change in GM1CD1 Ganglioside", LABORATORY INVESTIGATION, Vol. 67, No. 6, (1992), p. 711-715

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"P" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may show doubt on priority claim(s) or which is cited or examined in the prior art search
"O" document referring to the prior art (e.g. prior art document referring to a prior art disclosure, an exhibition or other means)
"F" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"X" document published after the international filing date but later than the priority date claimed
"Y" document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step from the document it takes issue
"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art
"X" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 November, 1998 (10. 11. 98)

Date of mailing of the international search report
24 November, 1998 (24. 11. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorised officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/03754

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
Y	M. ZICHE, et al., "Ganglioside Promote the Angiogenic Response" LABORATORY INVESTIGATION, Vol. 61, No. 6, (1989), p. 629-634

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP98/03754	
Box I. Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet) This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 9, 11 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 9 and 11 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy.	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(e).	
Box II. Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet) This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest <input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet) (1) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/03754

A. 発明の属する分類の種類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/557

B. 調査を行った分類
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/557

最小限資料以外の資料で調査を行った分類に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

C. 関連すると思われる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名、及び一箇の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 5-213862, A (水島裕, 生化学工業株式会社, 旭硝子株式会社), 24, 8月, 1993 (24, 08, 93), 特許請求の範囲, 第2頁右欄第15行~第3頁左欄第29行~第33行 & EP, 423697, A1 & US, 5120870, A & US, 5194670, A	1-8, 10, 12
Y	JP, 3-204853, A (水島裕, 生化学工業株式会社, 旭硝子株式会社), 6, 9月, 1991 (06, 09, 91), 特許請求の範囲, 第3頁左下欄第5行~第7頁右欄第11行 & EP, 423697, A1 & US, 5120870, A & US, 5194670, A	1-8, 10, 12

☒ C欄の図表にも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

- (A) 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- (E) 先行文献であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- (L) 優先権主張に照準を照らす文献又は他の文献の発行日よりしくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- (O) 口頭による開示、使用、展示等に基くする文献
- (P) 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
- (T) 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は発明の進歩のために引用するもの
- (X) 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- (Y) 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- (Z) 同一パテントファミリー文献

国際調査を終了した日

10. 11. 98

国際調査報告の提出日

24.11.98

国際調査機関の名称及び住所

日本国特許庁 (JSA/JP)

郵便番号 100-8916

東京都千代田区錦町三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある図表)

上様 のぶよ

4C 9454

電話番号 03-35681-1101 内線 3462

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/03754

C (続き) 関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリ*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示
Y	M. ZICHE, et al., 'Angiogenesis Can Be Stimulated or Repressed In vivo by a Change in CM3:G03 Ganglioside', p. 711-715 LABORATORY INVESTIGATION, Vol. 67, No. 6, (1992).
Y	M. ZICHE, et al., 'Ganglioside Promote the Angiogenic Response', p. 629-634 LABORATORY INVESTIGATION, Vol. 61, No. 6, (1989).

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/03754

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の欄を)
 法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成できなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9, 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
 つまり、
 請求の範囲 9, 11 は、人の手術又は治療による処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有益な国際調査をすることができず程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
 は、有益な国際調査をすることができず程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第2欄 発明の同一性が示されているときの意見 (第1ページの2の欄を)
 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の戻還の申立てに関する注意
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続き) (1992年7月)